# Instrucciones para uso de NEO-SENSITABS™

Revisión DBV0004F
Fecha de Publicación 12.04.2013
Idioma: Español

# NEO-SENSITABS™

**Ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos**

**Fabricante**
Rosco Diagnostica A/S, Taastrupgaardsvej 30, DK-2630 Taastrup, Dinamarca, www.rosco.dk

**Uso previsto**
Las tabletas Neo-Sensitabs se emplean en los ensayos semicuantitivos *in vitro* realizados para conocer la sensibilidad a los antimicrobianos mediante técnicas de difusión en agar con discos/tabletas de organismos comunes poco exigentes de crecimiento rápido, ciertos patógenos bacterianos exigentes y levaduras.

**Principios del método**
Las tabletas Neo-Sensitabs, que contienen diferentes agentes antimicrobianos, se dispensan en la superficie del agar adecuado, que ha sido inoculado con cultivos puros de aislados clínicos.

Los organismos poco exigentes, como las especies de *Enterobacteriaceae, Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterococcus* y *Vibrio cholerae*, pueden ser analizados en un medio de cultivo que no contenga sangre ni otros suplementos, como el agar Mueller-Hinton II (MH). Para el análisis de *Haemophilus influenzae* es necesario el empleo de medios de cultivo para el ensayo de Haemophilus (HTM), para el *Neisseria gonorrhoeae* es necesaria una base de agar GC (GCA), mientras que el *Streptococcus pneumoniae* y otros estreptococos necesitan agar Mueller Hinton II + sangre al 5 % (MH+B). Las levaduras se pueden analizar con agar RPMI-1640 o agar modificado de Shadomy, mientras que para los organismos anaerobios se deben emplear procedimientos especiales.[1,2]

Después de la incubación, se examinan las placas y se mide y se compara el diámetro de la zona de inhibición alrededor de las tabletas con las tablas de interpretación de cada antibiótico con el fin de determinar cuáles son los agentes antimicrobianos más adecuados para un tratamiento.

Las tabletas Neo-Sensitabs han sido estandarizadas de acuerdo con los valores límite (puntos de corte) de concentración mínima inhibitoria (MIC) recomendados por el CLSI (NCCLS)[3,4] y EUCAST. Además, las tabletas Neo-Sensitabs han sido ajustades a los puntos de corte de CMI recomendados por los "Grupos de estandarización de ensayos de sensibilidad" (Susceptibility Testing Standardization Groups) en Francia y el Reino Unido. Los criterios de interpretación de los diámetros de zona para cada país se pueden encontrar en el Neo-Sensitabs User's Guide (Manual del usuario de Neo-Sensitabs) (www.rosco.dk).[1]

**Reactivos**
Las tabletas Neo-Sensitabs miden 9 mm y contienen agentes antimicrobianos cristalinos mezclados cuidadosamente con un granulado para su protección. Las tabletas llevan impreso en ambos lados un código único formado por 5 caracteres. Las Dtabletas Neo-Sensitabs se suministran en cartuchos de 50 tabletas cada uno. Los cartuchos se pueden emplear con un dispensador de tabletas Neo-Sensitabs. El dispensador permite suministrar simultáneamente 7, 9, 12 ó 16 tabletas Neo-Sensitabs. Debido al hecho de que las tabletas tamponan el medio de cultivo, no es necesario ejercer ninguna presión en las tabletas.

**Instrucciones de conservación**

1) Después de su recepción, se deberá comprobar el símbolo de temperatura situado en el envase exterior. Las tabletas Neo-Sensitabs con el símbolo 2 °C a 8 °C se deberán conservar en el frigorífico, mientras que las tabletas Neo-Sensitabs con el símbolo de 25 °C como temperatura máxima impreso en el envase exterior se deberán conservar a temperatura ambiente.
2) Si los cartuchos de tabletas Neo-Sensitabs se conservan en el frigorífico, se deberá esperar hasta que alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlos (es decir, 30 – 60 minutos) para impedir que la humedad se condense sobre las tabletas.

3) Las tabletas Neo-Sensitabs con el símbolo de temperatura de 2 °C a 8 °C se pueden conservar a temperatura ambiente durante 2 meses como máximo sin que pierdan su actividad.
4) Los cartuchos abiertos y colocados en un dispensador se deberán utilizar dentro de los 2 meses siguientes (tabletas Neo-Sensitabs con el símbolo de temperatura de 2 °C a 8 °C) y en los 12 meses siguientes (tabletas Neo-Sensitabs con el símbolo de temperatura inferior a 25 °C).

La fecha de caducidad de los cartuchos se aplica únicamente a los cartuchos intactos y conservados a la temperatura adecuada.

**Precauciones**
Se deben tener en cuenta las instrucciones para uso. El funcionamiento de las tabletas Neo-Sensitabs depende no sólo de la potencia de las tabletas sino además del uso del inóculo y de las placas de agar adecuados, la temperatura de incubación, la interpretación correcta del diámetro de la zona, la conservación correcta de las tabletas Neo-Sensitabs y del uso de cepas de control.[5]

**Muestra**
La muestra debe ser típica del lugar de la infección: es decir, se deberá tomar una muestra representativa de las bacterias patogénicas en cuestión. Para más información, consulte las instrucciones para uso, en las que se incluye la preparación del inóculo.

## PROCEDIMIENTO

**Materiales suministrados:** Tabletas Neo-Sensitabs del tipo descrito en la etiqueta.

**Materiales necesarios, pero no suministrados:** Medios de cultivo, reactivos, organismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio necesario para realizar el ensayo de sensibilidad mediante técnicas de difusión en agar que respeten el procedimiento estandarizado. Prepare un estándar de 0,5 de turbidez de McFarland añadiendo 0,5 ml de $BaCl_2$ de 0,048 mol/l (1,175 % p/v de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) a 99,5 ml de $H_2SO_4$ de 0,18 mol/l (1% (vol/vol)) sin dejar de agitar. También se puede adquirir un estándar ya preparado. Se debe verificar mediante un espectrofotómetro con una banda de luz de 1 cm y una cubeta de referencia; la absorbancia a 625 nm debe encontrarse en el intervalo entre 0,08 y 0,10.[3,4]

### I. Instrucciones para uso/Bacterias

### I.1. Estandarización del inóculo de acuerdo con el CLSI (NCCLS) [3] y EUCAST

***Método de suspensión directa de colonias:***
Se prepara una suspensión de varias colonias morfológicamente parecidas, recogidas de una placa de agar (no selectivo) preparada 18-24 horas antes, en 4-5 ml de una solución de NaCl al 0,9 %, obteniendose usia turbidez equivalente al estándar de $BaSO_4$ (estándar de 0,5 de McFarland). Este método es equivalente al recomendado por el CLSI (NCCLS) y es más rápido. Se recomienda emplear este método para el análisis de los organismos exigentes como las especies de *Haemophilus*, *N. gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, neumococos/estreptococos y para la detección de la resistencia potencial de los estafilococos a la meticilina o la oxacilina.[3]

### I.2. Inoculación

a) En los 15 minutos siguientes, sumerja una torunda de algodón estéril en la suspensión ajustada y retire el exceso de inóculo de la torunda presionando firmemente el interior del tubo.
b) Las torundas se deben utilizar en los 15 minutos siguientes para inocular las placas de ensayo.
c) Inocule la superficie seca de la placa de agar adecuada frotando la torunda sobre la superficie. Deje secar la superficie durante 3-5 minutos o como máximo durante 15 minutos antes de dispensar las tabletas Neo-Sensitabs en el medio de cultivo.
d) Seleccione las tabletas adecuadas, por ejemplo las recomendadas por el CLSI (NCCLS).[6] No emplee más de nueve tabletas Neo-Sensitabs por cada placa de 150 mm o cuatro tabletas Neo-Sensitabs por cada placa de 100 mm cuando analice *H. influenzae, N. gonorrhoeae* y especies de *Streptococcus*.

### I.3. Incubación y lectura de las placas

a) Durante los 15 minutos siguientes, ponga la placa invertida en un incubador a una temperatura de 35 °C. Las especies de *Haemophilus*, *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* y otros estreptococos se deben incubar en una atmósfera enriquecida con $CO_2$ al 5%.
b) Examine las placas una vez que hayan transcurrido 16-18 horas de incubación (20-24 horas para *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* y otros estreptococos). Se recomienda incubar durante 24 horas las placas para la detección del *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina y de las especies de *Enterococcus* resistente a la vancomicina. Ponga la placa a contraluz y compruebe en las zonas de oxacilina y vancomicina si hay colonias diminutas resistentes a la meticilina o la vancomicina respectivamente en las zonas aparentes de inhibición. Cualquier crecimiento visible en la zona de inhibición indica resistencia a la meticilina o a la vancomicina. Los bordes de las zonas de inhibición contienen gran cantidad de pequeñas colonias si se emplean Las tabletas para trimetoprima, sulfonamidas y trimetoprima + sulfametoxazol. En este caso, las zonas de inhibición se miden hasta las colonias de tamaño normal (no tenga en cuenta los crecimientos ligeros y mida el borde más visible). Para más información, consulte el User's Guide Neo-Sensitabs (Manual del usuario de Neo-Sensitabs) (www.rosco.dk).[1]
c) El diámetro de las zonas de inhibición completa se determina mediante examen visual. Las zonas se miden milímetro más cercano.

### II. I. Instrucciones de uso/Levaduras

### II.1. Preparación del inóculo

El inóculo debe resultar en un crecimiento confluente. En el caso de la mayoría de las cepas, el inóculo debe contener aproximadamente $5x10^5$CFU/ml (estándar de 0,5 de McFarland diluido al 1:1 con solución salina). Si se desea analizar *Candida krusei*, deberá utilizarse un inóculo equivalente al estándar de 0,5 de McFarland, diluido al 1:10 y para las especies de *Cryptococcus* se debe usar un inóculo equivalente al estándar de 1,0 de McFarland sin diluir.

### II.2. Inoculación

a) Las placas se secan durante 20-25 minutos a una temperatura de 35 °C antes de inocularlas.
b) Se debe verter 0,5 ml (placa de 9 cm) o 1,0 ml (placa de 14 cm) del inóculo preparado sobre la superficie del agar (inundación) y se debe retirar el exceso de líquido con la ayuda de una pipeta.
c) La placa abierta se debe secar a una temperatura de 35 °C durante 10 minutos y, posteriormente, se deben dispensar las tabletas sobre la superficie del agar.

### II.3. Incubación y lectura de las placas

Para la mayor parte de las cepas aisladas de infecciones sistémicas, es adecuada la incubación a una temperatura de 35 °C durante una noche. Las placas se deben examinar y leer transcurridas entre 18 y 24 horas. Si no es visible todavía el crecimiento en ciertas cepas, las placas se pueden volver a incubar durante 24 horas más como máximo. En el caso de las especies de *Cryptococcus*, se pueden incubar las placas a una temperatura de 30 °C durante 42-48 horas.

### II.4. Lectura de las zonas de inhibición

En el caso de los polienos (anfotericina B y nistatina), se debe medir la zona clara sin crecimientos visibles. Para estos antifúngicos estas colonias dentro de esta zona se deben considerar como mutantes resistentes. En el caso de los azoles, imidazoles y la terbinafina, las zonas se deben medir hasta llegar a las colonias de tamaño normal. Frecuentemente, el tamaño de las zonas de inhibición de las colonias parcialmente inhibidas son más pequeñas cerca del comprimido que en el borde de la zona real. Estas colonias de tamaño pequeño y mediano no son mutantes resistentes. Las tabletas Neo-Sensitabs de Imidazoles/Azoles contienen doxiciclina para, de esta manera, facilitar la lectura de las zonas. En el caso de la fluorocitosina se debe medir la zona hasta alcanzar las colonias de tamaño normal. Las colonias individuales dentro de esta zona suelen ser mutantes *resistentes* (se deberán aislar y analizar de nuevo).

## CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El procedimiento de control de calidad con cepas ATCC se debe realizar al menos semanalmente y cada vez que se emplea un lote de agar diferente. El diámetro medido se debe encontrar dentro de los límites de la combinación espercificar de la tableta Neo-Sensitabs correspondiente y las cepas de control. Los límites de las cepas de control se detallan en las tablas y son indicativos del funcionamiento correcto de todo el procedimiento.[1,3]

## RESULTADOS

Se debe comparar el diámetro observado de la zona con los indicados en las tablas. Los resultados de un organismo determinado pueden ser sensible (S), intermedio (I) o resistente (R)[3]:
***Sensible (S):*** La infección causada por la cepa analizada debe responder a una dosis normal del agente antimicrobiano presente en el comprimido.
***Si sólo se especifican los criterios "S":*** En el caso de algunas combinaciones de organismos/antimicrobianos, la ausencia de cepas resistentes determina la categoría "sensible". En el caso de las cepas cuyos resultados puedan clasificarse como "no sensibles", se deben confirmar los resultados de la identificación del organismo y del ensayo de sensibilidad antimicrobiana. Además, los aislados se deben enviar a un laboratorio de referencia para realizar análisis complementarios.
***Intermedio (I):*** Esta categoría implica el empleo clínico en aquellas partes del cuerpo en las que los fármacos se concentran (por ejemplo, en la orina) o si se pueden emplear dosis elevadas de agentes antimicrobianos (por ejemplo, betalactámicos). En esta categoría intermedia se incluye también una "zona de tampón", que sirve para evitar que factores insignificantes e incontrolados de tipo técnico puedan causar discrepancias importantes en la interpretación. De esta manera, si una zona se encuentra en el intervalo intermedio, los resultados se pueden considerar como equívocos y, si no existen fármacos alternativos, se recomienda realizar análisis de concentración mínima inhibitoria (MIC).
***Resistente (R):*** No se puede recomendar en este caso el tratamiento con el agente antimicrobiano en cuestión.

**Ensayos de cribado y confirmatorios para las betalactamasas de espectro extendido (ESBL)**
Se han descrito betalactamasas codificadas por plásmidos transferibles que causan resistencia frente a las cefalosporinas de tercera generación y los monobactamos (por ejemplo, el aztreonam) en algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y otras enterobacteriáceas. Estas enzimas se clasifican como betalactamasas de espectro extendido y se las relaciona con la resistencia clínica a los monobactamos y las cefalosporinas de espectro amplio. Algunas de estas cepas presentarán zonas de inhibición inferiores a las cepas sensibles normales, pero superiores a los puntos de corte estándar de ciertas cefalosporinas de amplio espectro o del aztreonam. Estas cepas se pueden discriminar empleando puntos de corte adecuados para el cribado de betalactamasas de espectro extendido. La mayoría de las betalactamasas de espectro extendido son inhibidas por el ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam y se puede detectar rápidamente mediante una prueba de sinergia de doble disco (comprimido).[6] La ceftazidima + clavulanato y la cefepima + clavulanato son muy útiles en los ensayos confirmatorios de betalactamasas de espectro extendido. Para más información, consulte el Neo-Sensitabs User's Guide (Manual del usuario de Neo-Sensitabs) y Detection of resistance mechanisms (www.rosco.dk).[1] Todas las cepas de betalactamasas de espectro extendido se deben considerar como resistentes frente a todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam.

**Estafilococos resistentes a la meticilina**
El cribado de los estafilococos resistentes a la meticilina y los estafilococos coagulasa-negativos resistentes a la meticilina (oxacilina) se debe realizar empleando tabletas Oxacilina (1 µg) y Cefoxitina. La resistencia indica que todos los betalactámicos se deben considerar como resistentes. Para más información, consulte el User's Guide Neo-Sensitabs (Manual del usuario de Neo-Sensitabs) (www.rosco.dk).[1]

***Staphylococcus aureus* con sensibilidad reducida a la Vancomicina (hVISA, VISA(GISA) and VRSA)**
*El Staphylococcus aureus* resistente a la Vancomicina (VRSA) debería ser detectado usando Vancomicina 5 ug, pero la capacidad de detectarlo es desconocida (p.e. no evaluado ya que han sido detectados pocos aislados clínicos VRSA en el mundo). Las cepas con sensibilidad reducida a la Vancomicina (hVISA y VISA (GISA)) no pueden ser detectadas por los métodos actuales de difusión. Más información en la Guía del Usuario de Neo-Sensitabs (www.rosco.dk).

**Enterococos resistentes a la vancomicina (VRE)**
Para realizar el método de difusión con el objeto de detectar los enterococos resistentes a la vancomicina es necesario seguir el procedimiento siguiente:

1) Utilice Las tabletas Neo-Sensitabs Vancomicina (5 µg),
2) Incube durante 24 horas,
3) Examine cuidadosamente la zona de inhibición.

Las cepas sensibles tendrán un borde definido, mientras que el borde de las cepas resistentes será difuso. Para más información, consulte el User's Guide Neo-Sensitabs (Manual del usuario de Neo-Sensitabs) (www.rosco.dk).[1]

**Resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos (HLR)**
La resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos indica que un aislado de enterococo no es afectado sinérgicamente por una combinación de penicilina o un glucopéptido y un aminoglucósido. El cribado de alto nivel de resistencia frente a la gentamicina y la estreptomicina se debe realizar con aislados de enterococos obtenidos de muestras de sangre o de líquido cefalorraquídeo. Las tabletas Neo-Sensitabs con concentraciones elevadas, como Gentamicina (250 µg), Kanamicina (500 µg) y Estreptomicina (500 µg), se emplean en el cribado de este tipo de resistencia.

**LIMITACIONES DE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN**
Las tabletas Neo-Sensitabs permiten realizar análisis rápidos y precisos de la sensibilidad frente a los agentes antimicrobianos. Los resultados aceptables obtenidos con las cepas empleadas en el control de calidad no garantizan la precisión de todos los resultados obtenidos con los aislados de muestras de pacientes. Si se obtienen resultados atípicos o incongruentes, se deberá repetir el ensayo, el procedimiento de identificación o ambos con el fin de asegurar la precisión de los resultados. Los resultados inesperados se deben tener en cuenta en el informe, mientras que los cepas pueden enviarse a laboratorios de referencia para realizar análisis complementarios.
Se pueden obtener ***resultados potencialmente equívocos*** al analizar ciertos agentes antimicrobianos frente a determinados microorganismos.[3,6] Los mecanismos de resistencia de algunas especies son más difíciles de detectar que otros y algunos antibióticos pueden parecer activos *in vitro*, aunque los agentes antimicrobianos no sean efectivos clínicamente. Entre estas combinaciones se incluyen las siguientes:

- Todos los antibióticos betalactámicos (excepto la oxacilina y la meticilina) frente a los estafilococos resistentes a la meticilina.
- Las cefalosporinas, aminoglucósidos (excepto los ensayos para la determinación de la resistencia a alto nivel), la clindamicina y la trimetoprima + sulfametoxazol frente a los enterococos.
- Las cefalosporinas de primera y segunda generación y los aminoglucósidos frente a especies de *Salmonella* y *Shigella.*
- Las cefalosporinas frente a especies de *Listeria*.
- Glicopéptidos contra *S. aureus* con sensibilidad reducida a la Vancomicina.
- Las Cefalosporinas y Aztreonam, frente a cepas de *E. coli, K. pneumoniae* y *P. mirabilis* productoras de BLEES.

Los informes rutinarios de los resultados obtenidos con cepas aisladas de muestras de líquido cefalorraquídeo pueden causar errores peligrosos en la elección de la terapia en los casos siguientes:

- Fármacos administrados exclusivamente por vía oral
- Las cefalosporinas de primera y segunda generación (excepto cefuroxima sódica)
- Clindamicina
- Macrólidos
- Tetraciclinas
- Fluoroquinolonas

Algunos agentes antimicrobianos están asociados a la aparición de resistencias durante las terapias prolongadas. Como consecuencia, los aislados inicialmente sensibles pueden hacerse resistentes en el plazo de unos días después del comienzo del tratamiento. Esto ocurre con mayor frecuencia con:

- Las especies de *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia* con las cefalosporinas de tercera generación
- *Pseudomonas aeruginosa* con la mayoría de los agentes antimicrobianos
- Los estafilococos con las quinolonas

Esencialmente, todos los aislados de *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, las especies de *Providencia* y *Proteus* (con la excepción de *P. mirabilis*), *Serratia marcescens* y *P. aeruginosa* tienen los genes responsables de la producción de betalactamasa del grupo I. Por lo tanto, la demostración de la inducción *in vitro* de la enzima no proporciona ninguna información útil. Los laboratorios se deberán centrar en repetir los análisis (cada 3-4 días) con los aislados recogidos repetidamente de pacientes durante la terapia con el fin de detectar la selección de los clones que producen la betalactamasa del grupo I.

**REFERENCIAS:**

1) Neo-Sensitabs User's Guide. 2013. www.rosco.dk.
2) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standard M11-A6. 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
3) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2009. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2-S10. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
4) National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard M31-A2. 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa., USA.
5) Ericsson H.M. and J.C. Sherris. 1971. Antibiotic susceptibility testing. Report of an international collaborative study. Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B, Suppl. 217: 1-90.
6) Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.M100-S23.23rdInformationalSuppl.CLSI,Wayne,Pa.,USA.